

**SENSITIVITAS DAN SPESIFITAS ANTIBODI MONOKLONAL DSSE10
PADA *HEAD SQUASH TOXORHYNCHITES SPLENDENS*
DENGAN TEKNIK IMUNOHISTOKIMIA PEROKSIDASE**

Tika Fiona Sari¹, Sitti Rahma Umniyati²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit

²Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

**SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF MONOCLONAL ANTIBODY DSSE10 IN
HEAD SQUASH TOXORHYNCHITES SPLENDENS USING
IMMUNOHISTOCHEMICAL PEROXIDASE TECHNIQUE**

ABSTRACT

Dengue virus are transmitted from human to human by the bites of infective female *Aedes* mosquitoes from subgenus *Stegomyia*. One of the way to detect Dengue virus antigen is by using immunohistochemical technique. This method was reported to detect dengue virus antigen in low levels. The aims of this study is to measure sensitivity and specificity of monoclonal antibody DSSE10 using SBPC to detect antigen Dengue virus in *head squash Toxorhynchites splendens* were infected with dengue patient serum and RT-PCR as gold standart. Artificially-infected *Tx. splendens* mosquitoes with serum positif dengue virus were used as infectious samples and non-infected *Tx. splendens* mosquitoes were used as control negative. The immunohistochemichal SBPC assay using monoclonal antibody DSSE10 then applied in mosquitoes head squash to detect Dengue virus antigen. RT-PCR as a gold standart was applied in each mosquito thorax. The result were analyzed by descriptive stasistic test and 2x2 diagnostic test table. Monoclonal antibody DSSE10 using immunohistochemical SBPC assay in head squash *Tx. splendens* was gave sensitivity 87,09% and specificity 92,5%. Conclusion of this study is DSSE10 Monoclonal antibodies can be used as primary antibodies for the detection of dengue virus antigen in mosquito head squash

Keywords: Dengue viruses, SBPC, antibodies DSSE10, head squash, *Toxorhynchites splendens*

ABSTRAK

Virus Dengue ditularkan dari orang ke orang melalui gigitan nyamuk *Aedes* dari subgenus *Stegomyia*. Salah satu cara untuk mendeteksi antigen virus Dengue adalah dengan menggunakan teknik imunohistokimia. Metode imunohistokimia dilaporkan dapat mendeteksi antigen virus Dengue dalam kadar yang rendah. Tujuan penelitian ini adalah melakukan evaluasi sensitivitas dan spesifitas antibodi monoklonal DSSE10 dengan metode imunohistokimia Streptavidin Biotin Peroxidase Complex (SBPC) untuk mendeteksi antigen Dengue melalui sediaan *head squash* nyamuk *Toxorhynchites splendens* yang diinfeksi dengan serum penderita positif virus Dengue dengan baku emas RT-PCR. Sampel penelitian adalah nyamuk *Tx. splendens* yang diinfeksi secara *intrathorax* dengan serum positif virus Dengue dan serum negative virus Dengue, sedang kontrol positif adalah nyamuk yang diinfeksi virus Dengue serta nyamuk tanpa perlakuan sebagai kontrol negatif. Sediaan *head squash* nyamuk *Tx. Splendens* yang dibuat, diperiksa dengan uji imunohistokimia SBPC untuk mendeteksi antigen virus Dengue menggunakan antibodi monoklonal DSSE10. Pemeriksaan RT-PCR pada *thorax* nyamuk digunakan sebagai

baku emas untuk uji ini. Hasil penelitian dianalisis dengan statistik deskriptif dan tabel uji diagnostik 2x2. Hasil penelitian menunjukkan antibodi monoklonal DSSE10 dengan metode imunohistokimia SBPC pada sediaan *head squash* nyamuk *Tx. Splendens* untuk mendeteksi antigen virus Dengue mempunyai sensitivitas 87,09% dan spesifisitas 80,44%. Kesimpulannya adalah ntibodi monoklonal DSSE10 dapat digunakan sebagai antibodi primer untuk mendeteksi antigen virus Dengue pada *head squash* nyamuk.

Kata Kunci: virus Dengue, SBPC, antibodi DSSE10, *head squash*, *Toxorhynchites splendens*

PENDAHULUAN

Demam berdarah Dengue (DBD) atau *dengue hemorrhagic fever* (DHF) adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh virus Dengue, merupakan arbovirus dan termasuk dalam family Flaviviridae. Virus ini mempunyai empat serotipe yang dikenal dengan DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Virus Dengue ditularkan dari orang ke orang melalui gigitan nyamuk *Aedes* (*Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*) dari subgenus *Stegomyia*.

Demam Berdarah Dengue (DBD) pertama kali ditemukan di Indonesia pada tahun 1968 di Surabaya dan menyebar ke seluruh propinsi di Indonesia. (Depkes RI, 2005). Jumlah penderita DBD di Indonesia dilaporkan sebanyak 95.270 kasus dengan 1.298 diantaranya meninggal dunia. Tahun 2006 dilaporkan 106.425 kasus DBD dengan 1.132 kematian. DBD meningkat menjadi 188.185 kasus pada tahun 2007, dengan kematian mencapai 1.599 orang. Sedangkan pada tahun 2008 terjadi 101.656 kasus DBD dan 737 kematian. Kejadian DBD pada tahun 2005 mempunyai *Case Fatality Rate* (CFR) sebesar 1, 36%. CFR DBD pada tahun 2006 sebesar 1,06%, sedangkan tahun 2007 CFR menjadi 1,01%. Adapun pada

tahun 2008, sampai bulan September tercatat CFR sebesar 0,73% (WHO, 2008).

Pemeriksaan laboratorium untuk konfirmasi infeksi virus Dengue dapat dilakukan dengan cara (1) isolasi virus, (2) deteksi genom virus menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), (3) deteksi antigen virus serta (4) uji serologis (Kao *et al.*, 2005; Dutra *et al.*, 2009). Isolasi virus merupakan baku emas untuk menegakkan diagnosis infeksi virus Dengue, dengan menggunakan kultur sel dari sel AP/61, C6/36, atau TRA-284. Hasil kultur diidentifikasi dengan menggunakan teknik imunofluoresens (Aryati, 2006). Deteksi virus Dengue dapat juga dilakukan dengan teknik *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Metode RT-PCR diketahui cepat dan sensitif untuk mendeteksi RNA virus pada sampel penderita suspek dengue, jaringan autopsi maupun nyamuk (Lanciotti *et al.*, 1992). Keterbatasan metode ini adalah membutuhkan peralatan khusus dan mahal (Kao *et al.*, 2005).

Inokulasi pada nyamuk merupakan cara paling sensitif untuk mengisolasi virus dengue, selain itu penggunaan serangga yang tidak menghisap darah seperti nyamuk *Toxorhynchites sp.* dapat

dipakai untuk inokulasi dan isolasi virus dengue. Nyamuk *Toxorhynchites sp.* dipilih untuk pasase virus dengan pertimbangan ukuran tubuhnya yang lebih besar sehingga volume dari inokulum serum bisa ditoleransi 5 kali lebih besar dibanding dengan diinjeksikan pada *Ae. aegypti*, sehingga titer virusnya pun akan lebih tinggi. Selain itu, *Toxorhynchites sp.* merupakan *non-biting mosquitoes* sehingga teknisi/ peneliti tidak berisiko terinfeksi di laboratorium akibat gigitan nyamuk yang infeksius (Guzman and Kouri, 2004).

Metode lain yang dikembangkan untuk mendeteksi virus pada nyamuk adalah *Indirect Fluorescent Antibody (IFA) test* pada jaringan nyamuk, biasanya otak, kelenjar ludah atau sediaan pencet kepala (*head squash*). Beberapa tahun terakhir, telah dikembangkan metode baru untuk diagnosis virus Dengue yang lebih sensitif dan spesifik, antara lain *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* dan imunohistokimia *Streptavidin Biotin Peroxidase Complex (SBPC)*. Metode imunohistokimia dilaporkan dapat mendeteksi antigen virus Dengue dalam kadar yang rendah.

Team Dengue UGM telah berhasil memproduksi antibodi monoklonal terhadap virus Dengue antara lain antibodi yang disekresikan oleh sel hibrid (klon) DSSE10. Antibodi ini termasuk kelas IgG1 dan tidak menunjukkan reaksi silang dengan antigen *Japanese Encephalitis* dan *Chikungunya* (Umniyati, 2009). Selain itu antibodi monoklonal DSSE10 berhasil digunakan

untuk deteksi infeksi virus Dengue pada sel C6/36 yang telah diinokulasi dengan isolat lokal virus DEN-1, prototype (DEN-2), isolat lokal DEN-3, dan DEN-4 pada masa inkubasi hari ke-1 sampai hari ke-5 berdasarkan metode imunohistokimia dan imunofluoresen (Umniyati *et al.*, 2010).

Pengembangan penemuan antibodi monoklonal DSSE10 terus dilakukan dalam mencari terobosan baru untuk menemukan tes diagnostik infeksi Dengue yang efektif, sederhana dan cepat. Salah satu hal yang dapat menunjang pengembangan tersebut adalah karakterisasi antibodi monoklonal DSSE10. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui sensitivitas dan spesifitas antibodi monoklonal DSSE10 dengan metode SBPC dalam mendeteksi antingen melalui sediaan *head squash* nyamuk *Toxorhynchites splendens* yang diinfeksi dengan serum penderita dengue dengan baku emas RT-PCR.

METODE PENELITIAN

1. Sampel Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Penelitian dilaksanakan mulai Desember 2010 – Juli 2011. Sampel penelitian adalah nyamuk *Toxorhynchites splendens* berumur 3-4 hari yang berasal dari koloni Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM. *Toxorhynchites splendens* kemudian diinokulasi dengan serum pasien yang mengandung positif virus Dengue berdasarkan pemeriksaan RT-PCR (data sekunder). Kontrol positif

virus DEN-3 strain H87 dari NAMRU-2 Jakarta yang diinokulasi pada nyamuk dan diinkubasi selama 10 hari, sedang kontrol negatif berasal dari nyamuk yang tidak diinokulasi dengan virus Dengue.

2. Infeksi Nyamuk Uji

Penelitian diawali dengan membuat nyamuk *Tx. splendens* infeksius. Nyamuk *Tx. splendens* diambil satu-persatu memakai tabung reaksi dari kandang koloni laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM, setiap tabung berisi dua ekor sampai tiga ekor nyamuk. Nyamuk uji kemudian dipingsangkan dengan memasukkan tabung reaksi yang berisi nyamuk kedalam es batu dari freezer -20°C selama ± 5 menit, atau sampai nyamuk yang berada di dalam tabung pingsan. Serum pasien positif virus Dengue yang sudah diencerkan dengan PBS-BA 10% (1:5) sebanyak 2 μl diambil dari tabung aliquot dengan menggunakan jarum pada perangkat *intrathorax injection*. Nyamuk yang telah dipingsangkan diambil dari dalam tabung reaksi lalu disuntik di bagian thorak dengan serum pasien positif virus Dengue menggunakan perangkat *intrathorax injection*. Selanjutnya, nyamuk yang telah disuntik dimasukkan dalam *paper cup* dan diberi kapas yang sudah dicelup larutan gula dan dipelihara sampai masa inkubasi 10-14 hari. Nyamuk kontrol negatif disiapkan sama dengan prosedur penyiapan nyamuk yang diinfeksi, hanya sampel serum yang digunakan berasal dari serum yang hasil RT-PCR negatif.

3. Pemeriksaan imunohistokimia SBPC

Setiap *caput* nyamuk *Tx. splendens* dibuat sediaan *head squash*, kemudian difiksasi dengan methanol absolut dingin (-20°C) dan dikeringkan di suhu ruangan. Preparat di cat dengan metode imunohistokimia SBPC sesuai dengan metode Deubel and Depress (1997) yang sudah dimodifikasi. Kontrol positif menggunakan *head squash* nyamuk *Tx. splendens* diinfeksi virus DEN-3, sedangkan kontrol negatif adalah sediaan *head squash* nyamuk *Tx. splendens* tidak diinfeksi virus Dengue. Antibodi monoklonal DSSE10 1:10 dipakai sebagai antibodi primer. Hasil imunohistokimia SBPC pada sediaan *head squash* nyamuk disebut positif mengandung antigen virus Dengue jika terdapat butiran-butiran seperti pasir yang berwarna coklat dan tersebar di antara jaringan otak, disebut negatif jika bagian sitoplasma sel jaringan otak berwarna biru dan tidak ada butiran pasir (granula) berwarna coklat di sekitar sel-sel jaringan otak.

4. Isolasi RNA dan RT-PCR

RNA virus Dengue untuk pemeriksaan RT-PCR diisolasi dari setiap thorax nyamuk secara manual dengan menggunakan metode Deubel and Depress (1997) yang sudah dimodifikasi. RNA virus Dengue dideteksi menggunakan metode *One-Step Multiplex RT-PCR* menggunakan reagen *Superscript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Cat. No. 12574-

026) dengan menggunakan primer spesifik serotipe yang didesain oleh Yong *et al* (2007), dengan program sebagai berikut: (i) sintesis cDNA 1 siklus: 60°C selama 45 menit; (ii) predenaturasi 1 siklus: 94°C selama 2 menit; (iii) amplifikasi 35 siklus: 94°C selama 30 detik (denaturasi), 60°C selama 30 detik (*annealing*), 68°C selama 1 menit (ekstensi); (iv) ekstensi akhir 1 siklus: 68°C selama 5 menit. Produk RT-PCR dielektroforesis pada gel agarose 1,5% dan 100 bp *ladder* digunakan sebagai *marker* untuk menganalisis besar produk PCR. Ukuran pita hasil amplifikasi untuk

DEN-1: 342 *base pair* (bp) & DEN-3: 538 bp.

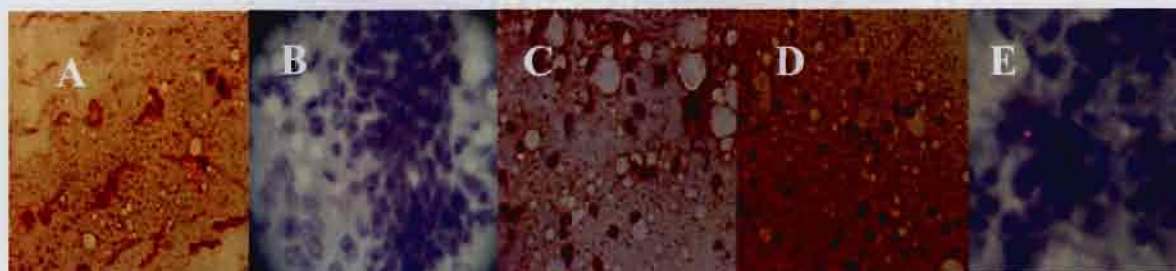
5. Analisa Data

Nilai sensitivitas, spesifisitas, nilai ramal positif dan nilai ramal negatif imunohistokimia SBPC dengan baku emas RT-PCR dihitung dengan perhitungan statistik menggunakan tingkat kemaknaan $\alpha=0,05$ dan interval kepercayaan 95%. Untuk membantu analisis statistik diagnostik digunakan tabel uji diagnostik 2 x 2 (Pusponegoro *et al.*, 2008).

HASIL PENELITIAN

1. Deteksi antigen Virus Dengue pada Sediaan *Head squash* menggunakan Uji Imunohistokimia SBPC

Hasil pemotretan sediaan mikroskopis imunohistokimia SBPC *head squash* nyamuk *Tx. splendens* disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Foto mikroskopis pada perbesaran 1000 memperlihatkan reaksi positif pada kontrol positif (warna coklat) yaitu nyamuk *Tx. splendens* yang diinfeksi virus Dengue-3 (A), reaksi negatif pada kontrol negatif (warna biru) yaitu nyamuk *Tx. splendens* yang tidak diinfeksi virus Dengue (B) nyamuk *Tx. splendens* yang diinfeksi serum positif Dengue dengan masa inkubasi 10 hari (C), 14 hari (D), dan nyamuk *Tx. splendens* yang diinfeksi serum negatif Dengue (E)

Gambar 1 menunjukkan bahwa sediaan *head squash* nyamuk yang diinfeksi serum positif Dengue terlihat adanya reaksi positif. Reaksi positif ditunjukkan dengan butiran-butiran

seperti pasir yang berwarna coklat dan tersebar di antara jaringan otak. Sedangkan sediaan kontrol negatif dan *head squash* nyamuk yang tidak diinfeksi virus Dengue memperlihatkan reaksi

negatif berupa sitoplasma sel yang berwarna biru dan tidak ada butiran pasir berwarna coklat di sekitar sel-sel jaringan otak. Hasil pemeriksaan imunohistokimia SBPC pada nyamuk yang diinfeksi serum positif Dengue dapat dilihat tabel 1.

Tabel 1. Analisis statistik diagnostik metode imunohistokimia pada sediaan *head squash* dengan baku emas RT-PCR pada thorax

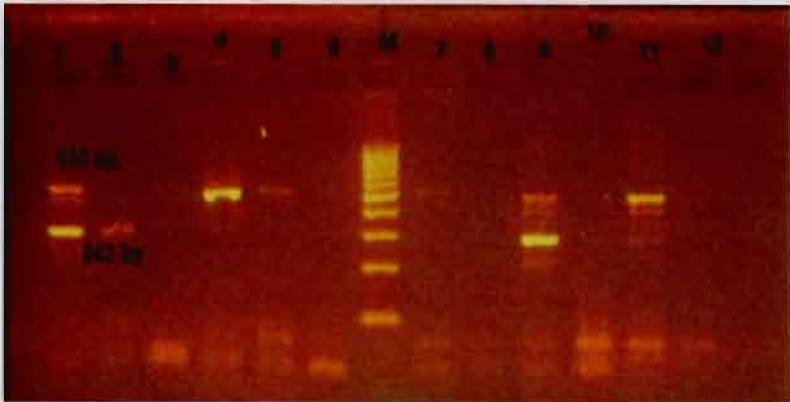
		Pemeriksaan RT-PCR		Jumlah
		(+)	(-)	
Metode imunohistokimia SBPC	(+)	27	9	36
	(-)	4	37	41
Jumlah		31	46	77
Hasil perhitungan*:				
Sensitivitas = 87,09%		Spesifisitas = 80,44%		
Nilai ramal (+) = 75%		Nilai ramal (-) = 90,24%		

* Interval Kepercayaan 95%

Tabel 1 menunjukkan bahwa antibodi monoklonal DSSE10 dengan metode imunohistokimia SBPC pada sediaan *head squash* mempunyai sensitivitas diagnostik sebesar 87,09%, dan spesifisitas diagnostik sebesar 80,44%. Nilai ramal positif untuk metode ini adalah sebesar 75%, serta nilai ramal negatif 90,24%.

2. Deteksi antigen Virus Dengue pada Subyek Penelitian berdasarkan Pemeriksaan RT-PCR

Pemeriksaan RT-PCR pada penelitian ini berhasil mendeteksi serotipe virus Dengue sesuai dengan ukuran pita yang diharapkan yaitu 342 bp untuk DEN-1 dan 538 untuk DEN-3 (Yong *et al.*, 2007). Gambaran hasil elektroforesis produk RT-PCR pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Foto hasil elektroforesis produk RT-PCR dari subyek penelitian pada gel agarose 1,5%. M: marker 100 bp ladder, 1: infeksi ganda DEN-1 dan DEN-3, Lane 2: DEN-1 (342 bp), Lane 3: nyamuk negatif, Lane 4: DEN-3, Lane 5: DEN-3, Lane 6: nyamuk negatif , M: Marker 100 bp ladder, Lane 7: DEN-3, Lane 8:

nyamuk negatif, Lane 9: infeksi ganda DEN-1 dan DEN-3, Lane 10: nyamuk negatif, Lane 11: infeksi ganda DEN-1 dan DEN-3, Lane 12: kontrol negatif.

PEMBAHASAN

Deteksi RNA virus Dengue pada penelitian ini juga dilakukan menggunakan *One step* RT-PCR dengan sampel berupa *thorax Tx. splendens*. Menurut Yamamoto *et al.* (1987) bagian-bagian thorax yang mengandung virus adalah hemosit, sel-sel lemak, sel-sel neuron dan kelenjar ludah. RT-PCR merupakan salah satu tipe PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuen asam nukleat yang berupa RNA. Kestabilan rantai RNA jauh lebih rendah dibanding rantai DNA (Sudjadi, 2008). Terlebih lagi dalam hal ini genom dari virus Dengue yang menjadi target deteksi pada penelitian ini adalah RNA *single strand* yang sangat mudah terdegradasi oleh nuklease. Oleh karena itu, proses deteksi RNA pun membutuhkan kecermatan yang lebih dibanding deteksi DNA.

Pada penelitian ini RNA virus Dengue pada nyamuk infeksius dengan masa inkubasi 10 hari dapat terdeteksi menggunakan RT-PCR, meskipun begitu ada beberapa sampel penelitian yang hasilnya negatif, walaupun sudah diinkubasi sampai 14 hari. Yasmon (2010) menyatakan bahwa negatif palsu pada pemeriksaan RT-PCR dapat disebabkan karena jumlah partikel virus yang terlalu rendah di dalam sampel. Menurut Adi dan Wuryadi (1990) virus DEN-2 pengenceran 10^{-1} dan 10^{-6} yang diinjeksi *intrathorax* pada *Toxorhynchites* memberikan hasil positif pada hari ke-7

dan ke-9 pasca inokulasi, pada penelitian lain disebutkan pengenceran virus Dengue di atas 10^{-4} akan memberikan hasil negatif (Lam *et al.*, 1986). Keterbatasan dalam penelitian ini adalah tidak dilakukannya pengukuran titer serum positif Dengue yang diinokulasikan ke tubuh nyamuk *Tx. splendens*, sehingga tidak dapat diketahui apakah titer virus Dengue yang diinjeksikan ke tubuh nyamuk *Tx. splendens* sudah mencapai titer minimal yang dapat terdeteksi oleh pemeriksaan RT-PCR.

Pada metode imunohistokimia SBPC yang dilakukan pada penelitian ini, antigen virus Dengue yang terlokalisir di sel-sel jaringan otak akan berikatan dengan antibodi monoklonal anti virus Dengue DSSE10. Adanya antibodi DSSE10 yang berikatan dengan antigen virus Dengue ini akan dikenali oleh antibodi sekunder yang berlabel biotin. Selanjutnya dengan penambahan konjugat streptavidin yang dilabel enzim horse radish peroxidase dan larutan substrat kromogen, maka antigen tersebut dapat terdeteksi dengan munculnya granula berwarna kecoklatan di sekitar sel yang terinfeksi. Hasil negatif ditunjukkan dengan adanya warna biru, ini disebabkan adanya penambahan hematoksin sebagai *counterstain*.

Hasil positif antigen Dengue dengan deteksi imunohistokimia SBPC mulai dapat terlihat pada inkubasi 10 hari, reaksi positif terlihat pada sel-sel jaringan

otak dan granula-granula kecoklatan yang menyebar pada jaringan otak. Hal ini menunjukkan bahwa imunohistokimia SBPC dengan antibodi monoklonal DSSE10 (1:10) dapat mendeteksi antigen virus DEN-1, virus DEN-3 dan virus DEN-4 yang bereplikasi pada nyamuk *Tx. splendens*, sehingga kemungkinan antibodi monoklonal DSSE10 mengenal *group common reactive epitop* yang dimiliki oleh semua serotipe virus Dengue. Foote (1959) menyatakan bahwa virus Dengue memerlukan masa inkubasi paling sedikit 8 hari di dalam tubuh nyamuk sebelum dapat ditularkan dalam bentuk yang virulen kepada inang manusia.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa antibodi monoklonal DSSE10 dengan metode imunohistokimia SBPC pada sediaan *head squash* nyamuk *Tx. splendens* mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (87,09% dan 80,44%). Widyastuti (2011) menyatakan bahwa berdasarkan hasil penelitian metode imunohistokimia SBPC menggunakan antibodi monoklonal DSSE10 pada sediaan *head squash* nyamuk *Aedes aegypti* yang diinfeksi secara *intrathorax* dengan virus Dengue-3 strain H87 selama 7 hari mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (100%; 91%).

Pada penelitian ini, ditemukan hasil negatif palsu dan positif palsu dari metode imunohistokimia SBPC, walaupun telah menggunakan antibodi primer yang spesifik virus Dengue, serta kontrol positif dan kontrol negatif. Penggunaan kontrol positif dan kontrol

negatif dimaksudkan sebagai indikator bahwa antibodi berikatan dengan struktur yang sesuai, sehingga sensitivitas dan spesifisitas prosedur imunohistokimia tersebut valid.

Hasil negatif palsu pada sediaan *head* imunohistokimia. Hasil positif palsu pada metode imunohistokimia dapat terjadi karena beberapa faktor. Pertama, adanya reaksi warna yang tidak spesifik, yang disebabkan oleh keberadaan peroksidase endogen yang memang dihasilkan oleh jaringan dan sel normal (Taylor and Shi, 2006). Pada penelitian ini telah dilakukan usaha meminimalisasi reaksi tersebut dengan menambahkan *peroxidase blocking solution* untuk menghilangkan aktivitas peroksidase endogen, namun kemungkinan pada beberapa sampel aktivitas peroksidase endogen belum dapat dihilangkan sepenuhnya.

Faktor kedua, yang juga mungkin menjadi penyebab hasil positif palsu, adalah terjadinya ikatan yang tidak spesifik antara komponen streptavidin dengan biotin endogen yang terdapat pada sel (Miller, 2001; Mount and Cooper; 2001; Singh, 2008). Biotin merupakan vitamin yang berperan sebagai koenzim dan terlibat dalam transfer CO₂. Ziegler (2000) menyatakan bahwa enzim yang mengandung biotin ditemukan dalam sel-sel neurosekretori pada *corpora cardiaca* dan di otak serangga.

Faktor ketiga yang kemungkinan berpengaruh pada timbulnya hasil positif palsu adalah faktor pencucian. Berdasarkan protokol yang tertera pada kit imunohistokimia yang digunakan,

disebutkan bahwa pencucian pada saat proses pewarnaan imunohistokimia dilakukan dengan durasi waktu 2x2 menit. Menurut Lam *et al.*, (1986) sediaan *head squash* cenderung lebih tebal dan banyak terkotori oleh artefak dari sisa-sisa jaringan sisik dan kitin, sehingga durasi waktu tersebut kemungkinan kurang sesuai untuk digunakan pada pencucian preparat *head squash* nyamuk.

squash dapat juga disebabkan oleh fiksasi yang kurang baik sehingga antigen virus Dengue rusak, dan akhirnya tidak dapat terdeteksi melalui metode

Selama ini, surveilan vektor Dengue khususnya di Indonesia hanya didasarkan pada indeks entomologis, sedangkan deteksi virus pada vektor belum banyak dikembangkan. Di sisi lain, deteksi virus Dengue pada tubuh vektor sebetulnya merupakan salah satu bagian yang penting dalam kegiatan survei

DAFTAR PUSTAKA

- Adi, M. dan Wuryadi, S. 1990. *Toxorhynchites* sebagai media isolasi virus dengue. *Cermin Dunia Kedokteran* 60: 17-19
- Aryati. 2006. Aspek laboratorium DBD. Dalam : S. Soegijanto, *Demam Berdarah Dengue*, Edisi 2, p. 117- 130. Airlangga University Press, Surabaya.
- Depkes RI, 2005. Pencegahan dan Pemberantasan Demam Berdarah Dengue di Indonesia. Ditjen PPM & PL Depkes RI. Jakarta.
- Deubel, V. and Depress, P. 1997. Current Protocol. Workshop on Molecular epidemiologi penyakit Demam Berdarah Dengue.
- Imunohistokimia SBPC memiliki keunggulan dibandingkan dengan RT-PCR, antara lain tidak membutuhkan peralatan laboratorium yang mahal sehingga bisa dilakukan di setiap laboratorium yang memiliki mikroskop cahaya, biaya pemeriksaan lebih murah dan preparat *head squash* dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama.
- #### KESIMPULAN
- Imunohistokimia SBPC dengan antibodi DSSE10 dapat dijadikan salah satu metode deteksi virus pada spesies vektor virus Dengue. Metode ini terbukti memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk mendeteksi virus Dengue-3 di nyamuk *Ae. aegypti* dan *Toxorhynchites splendens*.
- Biology of Dengue Virus. Institut Pasteur.
- Dutra, N.R., de Paula, M.B., de Oliveira, M.D., de Oliveira, L.L., and de Paula, S.O. 2009. The laboratorial diagnosis of Dengue: applications and implications. *J Global. Infect. Dis.* 1: 38-44.
- Foote, R.H. and Cooke, D.R. 1959. Mosquito transmitted Diseases. Mosquitoes of Medical Importance. Agricultural Research Service. US. Government Printing Office. Washington D.C.
- Guzman, M.G. and Kouri, G. 2004. Advances in Dengue Diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3, (6):621-627.

- Kao, C.L., King, C.C., Chao, D.Y., Wu, H.L., and Chang, G.J.J. 2005. Laboratory diagnosis of dengue virus infection : current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 38: 5-16.
- Lam, S.K., Chew, C.B., Poon, G.K., Ramalingam, S., Seow, S.C., and Pang, T. 1986. Isolation of dengue viruses by intracerebral inoculation of mosquito larvae. *J. Virol. Methods.* 14: 133-140.
- Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J., and Vorndam, A.V. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30(3): 545-551.
- Miller, R.T. 2001. True Positive vs False Positive Staining. *The Focus Immunohistochemistry.* p. 1-2
- Mount, S.L. and Cooper, K. 2001. Beware of Biotin : A Source of False-Positive Immunohistochemistry. *Current Diagn. Pathol.* (7): 161-7
- Pusponegoro, H.D., Wirya, I.W., Pudjiadi, A.H., Bisanto, J., Zulkarnain, and S.Z. 2008. Uji diagnostik. Dalam : S. Sastroasmoro dan S. Ismael (ed.). *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis*, Edisi 3, p. 193-215. Sagung Seto, Jakarta.
- Singh, A.P. 2008. Use of immunohistochemistry. Available from : <http://boneandspine.com/musculoskeletalpathology/immunohistochemistry/>
- Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*, Edisi 1. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Taylor, C.R. and Shi, S.R. 2006. Practical Issues: fixation, processing and antigen retrieval In: C.R. Taylor and Richard J.C.(ed). *Immunomicroscopy A Diagnostic Tool for The Surgical Pathologist* 3rd edition. P. 71-74. Elsevier Inc. Philadelphia USA.
- Umniyati, S.R., Sutaryo, Wahono, D., Artama, W.T., Mardihusodo, S.J., Soeyoko, Mulyaningsih, B., and Utoro, T. 2008. Application of monoclonal antibody DSSC7 for detecting dengue infection in *Aedes aegypti* based on immunocytochemical streptavidin biotin peroxidase complex assay (ISBPC). *Dengue Bulletin.* 32: 83-98.
- Umniyati, S.R., 2009. *Teknik Imunositokimia dengan Antibodi Monoklonal DSSC7 untuk Kajian Patogenesis Infeksi dan Penularan Transovarial Virus Dengue serta Surveilansi Virologis Vektor Dengue*, Disertasi untuk derajat Doktor dalam Ilmu Kedokteran, Program Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Umniyati, S.R., Sutaryo, Wahyono, D., and Artama, W.T., 2010. *Deteksi dini infeksi virus dengue dengan teknik imunokromatografi menggunakan antibodi monoklonal*. Laporan Penelitian Hibah Kompetitif Penelitian Strategis Nasional.
- Widyastuti, D. 2011. *Deteksi infeksi virus Dengue-3 pada nyamuk Aedes aegypti dengan teknik imunositokimia menggunakan antibodi monoklonal DSSE10*.

- Tesis S2 Ilmu Kedokteran Tropis FK UGM.
- Yamamoto, N., Kimura, T., and Ohyama, A. 1987. Multiplication and distribution of type 2 Dengue and Japanese Encephalitis viruses in *Toxorhynchites splendens* after intratoracic inoculation. *Arch. Virol.* 97: 37-47
- Yasmon, A., Fatmawati, N.N.D., Ibrahim, F. and Bela, B. 2010. A second generation of RT-PCR assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *Med. J. Indones.* (19): 154-7
- Yong, Y.K., Thayan, R., Chong, H.T., and Sekaran, S.D. 2007. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore. Med. J.* 48(7): 662-68.
- Ziegler, R., Engler, D.L, and Davis, N.T. 2000. Biotin-Containing Proteins of The Insect Nervous System, a Potential Source of Interference with Immunocytochemical Procedures. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* (25): 569-574